

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium. Proses fraksinasi yang digunakan adalah fraksinasi bertingkat. Metode ekstraksi yang digunakan adalah metode maserasi. Pengujian antibakteri dilakukan secara *in vitro* dengan metode yang digunakan adalah metode difusi cakram.

4.2 Lokasi Penelitian

Dalam penelitian ini dilakukan pada banyak lokasi seperti : proses ekstraksi dan fraksinasi serta skrining fitokimia dilaksanakan di Laboratorium Sintesis, penimbangan simplisia dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Farmasi. Proses sterilisasi alat dan pengujian antibakteri dengan difusi cakram dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Biomedik Universitas Muhammadiyah Malang, pada bulan Mei 2018

4.3 Alat Penelitian

Variabel penelitian merupakan karakteristik objek yang dapat diklasifikasikan kedalam sekurang-kurangnya dua klasifikasi

4.3.1 Alat Pembuatan Serbuk Simplisia

1. Mesin penggiling (Blender)
2. Pengayak mesh 20 dan 40
3. Timbangan analitik balance *Scout Pro 400 g*
4. Oven BINDER

4.3.2 Alat Ekstraksi

1. Gelas ukur
2. Gelas piala 1000 ml *Pyrex Iwaki TE_32*
3. Desikator
4. Cawan Porselen Ø 10 cm
5. Penyaring Buchner 100 mm
6. Batang pengaduk
7. Oven BINDER

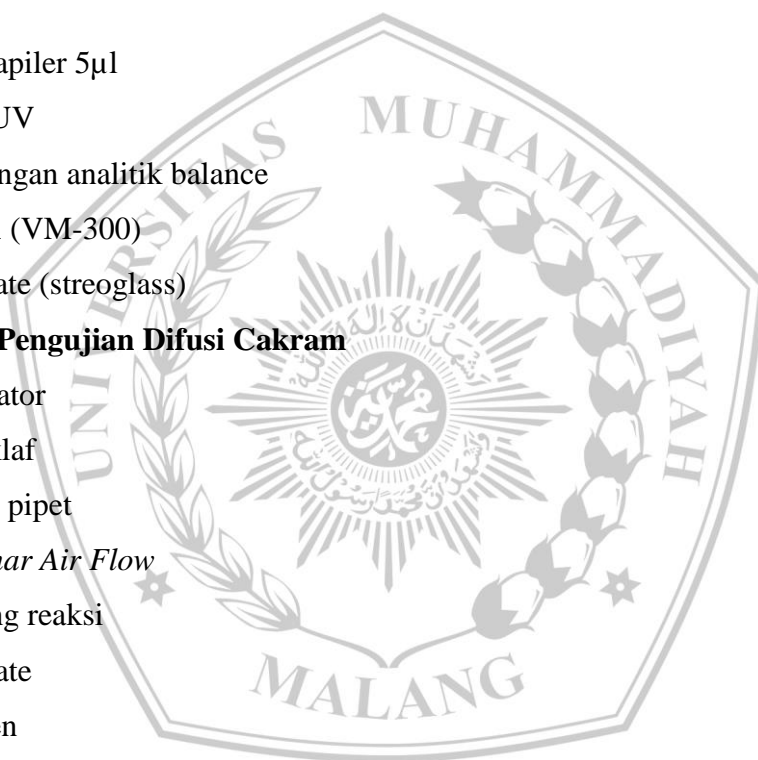
8. Pipet tetes
9. Sudip besi 20 cm
10. Erlenmeyer 1000 ml
11. *Rotary evaporator vacuum Buchi R-215*

4.3.3 Alat Identifikasi Senyawa dengan KLT

1. Cawan porselen
2. *Chamber*
3. Lempeng KLT
4. Penampak noda
5. Pinset
6. Pipa kapiler 5 μ l
7. Sinar UV
8. Timbangan analitik balance
9. Vortex (VM-300)
10. Hotplate (streoglass)

4.3.4 Alat Pengujian Difusi Cakram

1. Inkubator
2. Autoklaf
3. Micro pipet
4. *Laminar Air Flow*
5. Tabung reaksi
6. Hotplate
7. Bunsen
8. Kertas saring
9. Erlenmeyer
10. Cawan petri
11. Kawat ose
12. Oven
13. Jangka sorong
14. Lidi steril
15. Yellow Tip dan Blue Tip
16. Eppendroff



4.4 Bahan Penelitian

4.4.1 Bahan Uji

Bahan tanaman uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah umbi bawang dayak (*Eleutherine palmifolia*) yang diperoleh dari daerah kota Palangka Raya dan telah diserbukkan oleh UPT. Balai Materia Medika Batu, Dinas Kesehatan, Jawa Timur. Penelitian ini mengambil sampel umbi bawang dayak (*Eleutherine palmifolia*) dengan warna merah keunguan dan ukuran panjang 5 cm dan diameter 3 cm.

Bakteri uji adalah *Staphylococcus aureus* diperoleh dari Laboratorium Biomedik Universitas Muhammadiyah Malang.

4.4.2 Sampel Bakteri

Bakteri uji *Staphylococcus aureus* diisolasi pada media *Mueller Hinton Broth* (MHB) dan media *Mueller Hinton Agar* (MHA) diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

4.4.3 Proses Ekstraksi

1. Pelarut etil asetat teknis (*Bratachem*)
2. Umbi bawang dayak (*Eleutherine palmifolia*)

4.4.4 Identifikasi Senyawa Dengan KLT

1. Etil asetat teknis (*Bratachem*).
2. Asam formiat pro analisis (Merck)
3. Asam sulfat 10% (Merck)
4. FeCl_3 1% (Merck)
5. Larutan KOH 10% dalam etanol (Merck)
6. NaCl 10% (Merck)
7. Reagen Dragendorff (*Bratachem*)
8. Reagen anisaldehyda-asam sulfat (*Bratachem*)
9. Lempeng KLT silika gel 60 F₂₅₄ (Merck)

4.4.5 Pegujian Antibakteri

1. Fraksi etil asetat umbi bawang dayak (*Eleutherine palmifolia*)
2. Aqudest steril (Otsu)
3. DMSO 1% (Merck)
4. *Mueller Hinton Broth* (Oxoid)

5. *Mueller Hinton Agar* (Oxoid)
6. *Kloramphenicol* 2 µg/disk (Merck)
7. *Staphylococcus aureus*

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah komponen senyawa kimia pada fraksi etil asetat umbi bawang dayak (*Eleutherine palmifolia*) dengan konsentrasi yaitu: 20 mg/ml; 40mg/ml; dan 60mg/ml pada bakteri *Staphylococcus aureus*.

4.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah diameter zona hambat yang dihasilkan oleh senyawa uji yang ditandai dengan adanya daerah bening di sekitar senyawa uji yang ada pada media agar sebagai parameter untuk menentukan hambat minimum senyawa dari fraksi etil asetat.

4.6 Metode Penelitian

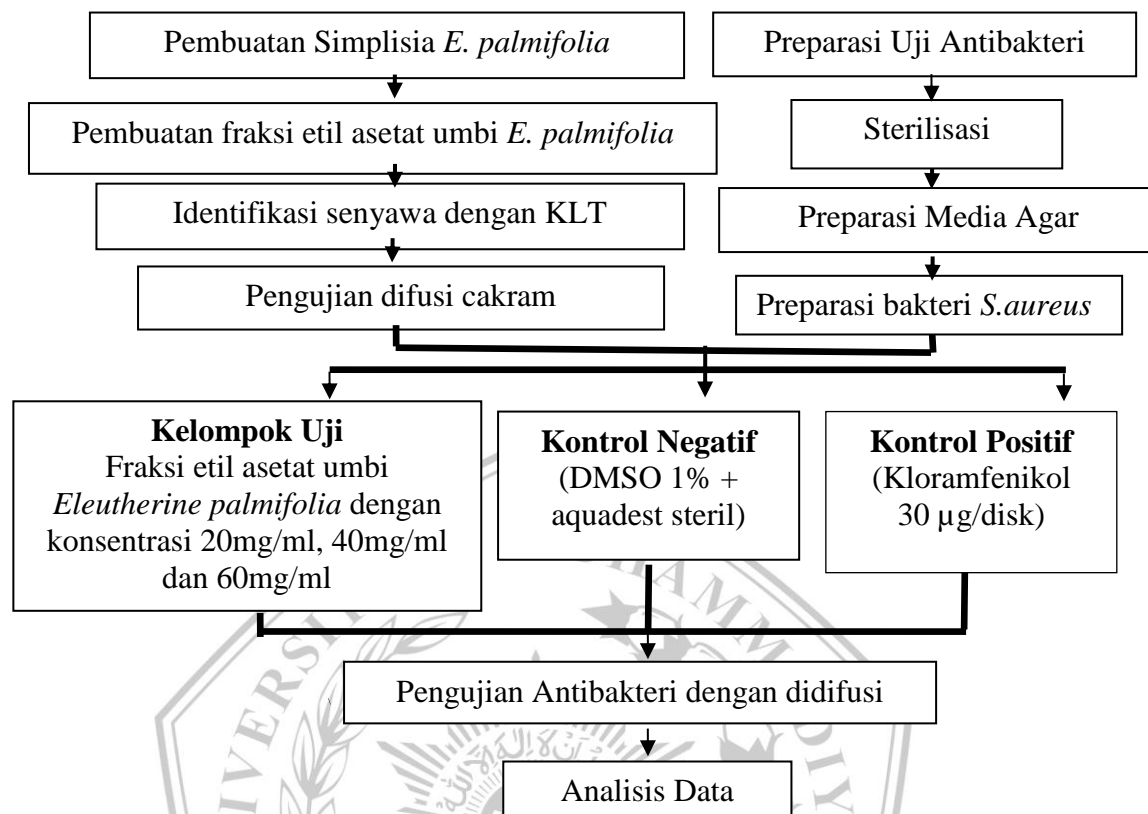
Metode pengumpulan data menggunakan kuisioner. Kuesioner merupakan teknik pengumpulan data yang digunakan dengan cara memberikan seperangkat pertanyaan atau pernyataan tertulis kepada responden untuk dijawab dengan cara memberikan pertanyaan kepada responden untuk mendapatkan data. Bentuk pertanyaan pada kuisioner adalah pertanyaan terbuka dan pertanyaan tertutup (Notoatmodjo, 2012).

4.6.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri untuk zona hambat bakteri *Staphylococcus aureus* dari fraksi etil asetat umbi *Eleutherine palmifolia* secara *in vitro* dengan metode difusi cakram. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan dua perlakuan yakni kelompok uji dan kelompok kontrol. Penelitian ini melalui beberapa tahapan, yaitu:

1. Preparasi bahan (Bahan Uji)
2. Penarikan komponen senyawa/Ekstraksi
3. Pemisahan komponen senyawa dengan metode KLT
4. Pengujian antibakteri dengan metode difusi cakram

4.6.2 Kerangka Operasional



Gambar 4.1 Kerangka Operasional

4.7 Sterilisasi

Sebelum semua alat digunakan dilakukan proses sterilisasi untuk menghilangkan kemungkinan terjadinya kontaminasi.

4.7.1 Sterilisasi Kering

Sterilisasi kering meliputi cara sterilisasi dengan api langsung dan cara sterilisasi dengan oven pemanas.

1. Sterilisasi dengan api langsung

Sterilisasi ini dilakukan terhadap peralatan seperti jarum Oase, pinset, spatel, mulut tabung biakan dan batang pengaduk.

2. Sterilisasi dengan oven pemanas

Oven pemanas digunakan untuk sterilisasi peralatan gelas yang tidak berskala, seperti cawan petri, tabung reaksi dan pipet. Alat-alat yang disterilkan dimasukkan kedalam oven setelah suhu mencapai 160°C selama 1-2 jam.

4.7.2 Sterilisasi Basah

Sterilisasi dilakukan dengan menggunakan autoklaf. Peralatan yang disterilkan dengan sterilisasi basah diantaranya gelas ukur, Erlenmeyer, pipet tetes, media *Mueller Hinton Broth* (MHB) serta *Mueller Hinton Agar* (MHA). Proses sterilisasi ini dilakukan pada suhu 121°C selama 15-20 menit.

4.8 Prosedur Kerja

4.8.1 Preparasi Sampel (Bahan Uji)

Sampel yang diteliti adalah umbi *Eleutherine palmifolia*. Umbi dibersihkan, ditiriskan, diiris tipis-tipis dan ditimbang, kemudian dikeringkan. Pengeringan pada suhu ruang dengan cara diangin-anginkan tanpa terkena sinar matahari langsung. Setelah kering kemudian dihaluskan dengan mesin penggilingan, sehingga diperoleh serbuk halus. Selanjutnya diayak menggunakan *Shieve Shaker* dengan derajat kehalusan tertentu (Farmakope Herbal Indonesia, 2009). Kemudian dilakukan pengukuran MC untuk mengetahui kadar air yang masih terdapat dalam ekstrak dengan memasukkan 2 gram ekstrak kering ke dalam alat MC, tekan *enter* pada alat hingga alat berbunyi. (replikasi 3 kali).

4.8.2 Proses Ekstraksi Bahan Uji Dengan Pelarut etil asetat

Pada proses ekstraksi yang akan dilakukan pada penelitian ini adalah dengan metode maserasi bertingkat dengan menggunakan 3 macam pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda yaitu pelarut *n*-heksana, etil asetat dan etanol.

Dalam pembuatan ekstraknya digunakan serbuk umbi bawang dayak (*Eleutherine palmifolia*) sebanyak 2 kg yang diekstraksi dengan pelarut etil asetat dengan menggunakan metode maserasi perendaman selama 24 jam sebagai berikut berikut:

1. Serbuk umbi *E.palmifolia* ditambahkan dengan pelarut etil asetat sebanyak 20000 ml (perbandingan 1:10), rendam selama 24 jam, kemudian saring dengan corong buchner tampung filtratnya. (Filtrat 1 dan residu 1)
2. Residu 1 dimaserasi kembali dengan etil asetat sebanyak 10000 ml (perbandingan 1:5), direndam selama 24 jam. Saring dan tampung filtratnya (filtrat 2 dan residu 2).

3. Residu 2 dimaserasi kembali dengan etil asetat sebanyak 10000 ml (perbandingan 1:5), direndam selama 24 jam. Saring dan tampung filtratnya (filtrat 3 dan residu 3).
4. Residu 3 dimaserasi kembali dengan etil asetat sebanyak 10000 ml (perbandingan 1:5), direndam selama 24 jam. Saring dan ampung filtratnya (filtrat 4 dan residu 4).
5. Proses maserasi ini dilakukan dengan metode yang sama secara berulang sampai pada filtrat tidak lagi menunjukkan ada komponen yang tertarik dengan pelarut etil asetat (maserasi dilakukan hingga semua senyawa yang terdapat pada umbi *E.palmifolia* tertarik oleh pelarut etil asetat. Hal ini ditandai dengan jika dilakukan pada tes pada plat KLT tidak ada noda yang terbentuk pada plat KLT).
6. Filtrat dikumpulkan lalu dipekatkan dengan *rotary evaporator vacuum* dengan suhu 45° C sampai diperoleh larutan ekstrak kental.
7. Kemudian pindahkan ekstrak kental ke cawan porselen. Ekstrak kental dikeeringkan di oven pada suhu 40°C.

4.8.3 Pemisahan Senyawa dengan KLT

Ekstrak etil asetat *E.palmifolia* ditimbang sebanyak 50 mg, dilarutkan dalam 1 ml etil asetat pada wadah tertutup rapat, kemudian di vortex selama 30 menit. Totolkan sebanyak satu kapiler (5µl) pada lempeng KLT, kemudian dieluasi dengan berbagai macam fase gerak.

Pemilihan eluen etil asetat dan etil asetat memiliki alasan bahwa kedua eluen tersebut cenderung stabil dan memiliki viskositas yang rendah, selain itu kombinasi eluen tersebut memberikan selektifitas yang memadai untuk campuran bahan yang akan dipisahkan khususnya pada penelitian ini bersifat semipolar. Eluen dipilih pada konsentrasi yang sesuai dengan sampel yang dipisahkan agar kromatografi dapat berjalan dengan baik pemilihan kombinasi eluen ditujukan agar tidak memberikan hasil yang bervariasi.

1. Fase diam: silica gel TLC 60 F254
2. Optimasi fase gerak
 - a. *n*-heksana: Etil asetat (6:4)
 - b. *n*-heksana: Etil asetat (7:3)

c. *n*-heksana: Etil asetat (3:7)

d. *n*-heksana: Etil asetat (5:5)

4.8.4 Identifikasi Komponen Senyawa

Komponen senyawa yang sudah dipisahkan dengan metode KLT dilakukan identifikasi senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada ekstrak etil asetat umbi *E.palmifolia* dengan penampak noda sebagai berikut:

Alkaloid : dragendorff (noda berwarna jingga)

Triterpenoid : anisaldehida - asam sulfat. Panaskan lempeng pada suhu 100° C selama 5-10 menit (noda berwarna ungu)

Flavonoid : uap amonia atau asam sulfat 10% (noda berwarna kuning intensif)

Polifenol : besi (III) klorida 1% (noda berwarna hitam)

Antraknon : larutan kalium hidroksida 10% dalam etanol (noda berwarna jingga atau merah)

4.8.5 Persiapan Pembuatan Konsentrasi Larutan Uji

Berdasarkan dari penelitian sebelumnya diketahui konsentrasi tiap tanaman sebagai antibakteri sehingga pada konsentrasi persiapan konsentrasi larutan uji fraksi etil asetat *E.palmifolia* menggunakan perbandingan konsentrasi sebagai berikut :

Konsentrasi 1 = fraksi etil asetat bawang dayak (*Eleutherine palmifolia*) 20mg/ml

Konsentrasi 2 = fraksi etil asetat bawang dayak (*Eleutherine palmifolia*) 40mg/ml

Konsentrasi 3 = fraksi etil asetat bawang dayak (*Eleutherine palmifolia*) 60mg/ml

4.8.6 Pembuatan Konsentrasi Larutan Uji

Langkah-langkah pembuatan konsentrasi larutan uji dibuat, sebagai berikut:

1. Ditimbang fraksi etil asetat *Eleutherine palmifolia* 20 mg kemudian ditambahkan DMSO 1% dengan melarutkan 0,01 ml DMSO dalam aquades steril sampai 1 ml, Sehingga diperoleh larutan uji konsentrasi 1 dari bawang dayak 20 mg/ml
2. Ditimbang fraksi etil asetat *Eleutherine palmifolia* 40 mg kemudian ditambahkan DMSO 1% dengan melarutkan 0,01 ml DMSO dalam aquades steril sampai 1 ml, Sehingga diperoleh larutan uji konsentrasi 1 dari bawang dayak 40 mg/ml

3. Ditimbang fraksi etil asetat *Eleutherine palmifolia* 60 mg kemudian ditambahkan DMSO 1% dengan melarutkan 0,01 ml DMSO dalam aquades steril 1 ml, Sehingga diperoleh larutan uji konsentrasi 1 dari bawang dayak 60 mg/ml

4.8.7 Pembuatan Media

Dalam penelitian ini digunakan dua media yakni *Mueller Hinton Agar* (MHA) dan media *Mueller Hinton Broth* (MHB).

1. Pembuatan Mueller Hinton Agar (MHA)

Pembuatan media *Mueller Hinton Agar* (MHA) dengan melarutkan bahan sebanyak 38 gram (dengan komposisi : *Beef dehydrate infusion* 300 g, *Casein hydrolysate* 17.5 g, *Starch* 1.5 g dan *Agar* 15 g) ke dalam 1 L aquadest pada erlenmeyer dengan kapasitas 1 L. Erlenmeyer diletakkan diatas hot plate kemudian masukkan magnetic stirer untuk mempercepat pelarutan sampai didapatkan larutan media menjadi berwarna kuning jernih. Setelah itu erlenmeyer ditutup dengan aluminium foil kemudian disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121° C. Dituang media steril ke cawan petri steril secara aseptis di dalam LAF. (Hafsan *et al.*, 2015).

2. Pembuatan Mueller Hinton Broth (MHB)

Pembuatan media *Mueller Hinton Broth* (MHB) dengan melarutkan bahan sebanyak 21gram (dengan komposisi : *Beef infusion* 2 g, *Casein hydrolysate* 17.5 g, dan *Starch* 1.5 g) ke dalam 1 L aquadest pada erlenmeyer dengan kapasitas 1 L. Erlenmeyer diletakkan diatas hot plate kemudian masukkan *magnetic stirer* untuk mempercepat pelarutan sampai didapatkan larutan media menjadi berwarna kuning jernih. Setelah itu erlenmeyer ditutup dengan aluminium foil kemudian disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Dituang media steril ke cawan petri steril secara aseptis di dalam LAF (Hafsan *et al.*, 2015).

4.8.8 Pembuatan Standar Mc Farland

Diambil aquadest kira-kira setengah dari tabung reaksi. Kemudian tambahkan H₂SO₄ 1% sebanyak 9950 µL dan BaCl₂ 1% sebanyak 50µl. Campur kedua larutan dalam tabung tersebut, dikocok sampai homogen dan terbentuk larutan keruh. Kekeruhan ini dipakai sebagai suspensi bakteri dengan tingkat kekeruhan 10⁸ CFU/ml (Sutton, 2011).

4.8.9 Perwarnaan Bakteri Uji

Perwarnaan bakteri uji yang dilakukan adalah pewarnaan Gram. Perwarnaan bakteri dilakukan untuk identifikasi dan untuk memastikan tidak ada kontaminan pada kultur kerja. Objek kaca yang digunakan dibersihkan dengan alkohol 96% dan dikeringkan. Kemudian tambahkan aquadest 1 tetes di atas objek kaca, dan ambil biakan bakteri yang akan dilakukan pewarnaan dengan ose steril (biakan bakteri yang diambil 1 koloni), kemudian ratakan biakan bakteri di permukaan objek kaca yang telah berisi aquadest. Kemudian difiksasi dengan api bunsen (lewatkan di atas api 2-3 kali). Setelah kering, pertama ditetesi dengan pewarna *Crystal Violet* kemudian tunggu 1 menit lalu bilas dengan aquadest. Kedua, ditetesi dengan *Lugol* dan tunggu 1 menit lalu bilas dengan aquadest. Ketiga, bilas dengan alkohol 96% lalu bilas dengan aquadest. Keempat, ditetesi pewarna *Safranin* dan tunggu 1 menit lalu bilas dengan aquadest kemudian keringkan dengan tisu. Periksa dengan mikroskop (perbesaran 100 x 10), bakteri yang tetap berwarna ungu digolongkan kedalam bakteri Gram positif. Sedangkan bakteri Gram negatif juga berwarna ungu tetapi penggunaan *Safranin* akan mewarnai sel Gram negatif menjadi berwarna merah, sedangkan Gram positif tidak terpengaruh (Hafsan *et al*, 2015; Back, 2001).

4.8.10 Preparasi Bakteri

Proses peremajaan bakteri diperoleh dari biakan murni sebanyak satu ose kemudian digoreskan dengan 3-4 bagian secara horizontal pada cawan petri yang berisi media *Mueller Hinton Agar* (MHA). Kemudian diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Sebelum membuat suspensi bakteri, siapkan terlebih dahulu standar McFarland dengan tingkat kekeruhan 10^8 CFU/ml. Kemudian lakukan pembuatan suspensi bakteri dengan teknik dilusi (pengenceran). Bakteri uji diambil dari hasil peremajaan menggunakan ose steril kemudian dimasukkan ke dalam 5 ml aquadest steril (tabung A), dikocok menggunakan *vortex* dan dibandingkan dengan standar McFarland 10^8 CFU/ml. Jika kekeruhan sudah sama maka dilakukan pengenceran hingga didapatkan jumlah koloni bakteri yang diinginkan, yaitu 10^6 CFU/ml.

Pengenceran dilakukan dengan diambil 1 ml dari tabung A kemudian dilarutkan dengan Aquadest sampai 10 ml (tabung B) dengan jumlah koloni bakteri

10^7 CFU/ml, kemudian diambil 1 ml dari tabung B dilarutkan dengan Aquadest sampai 10 ml (tabung C), diperoleh koloni bakteri 10^6 CFU/ml. Kemudian dari tabung C dilakukan penggoresan pada media MHA yang diambil menggunakan kapas lidi steril dan digoreskan dengan 3-4 bagian secara horizontal, lalu putar cawan 90° . Lanjutkan goresan sampai merata. Setelah selesai menggores, bakteri diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Hafsan *et al.*, 2015).

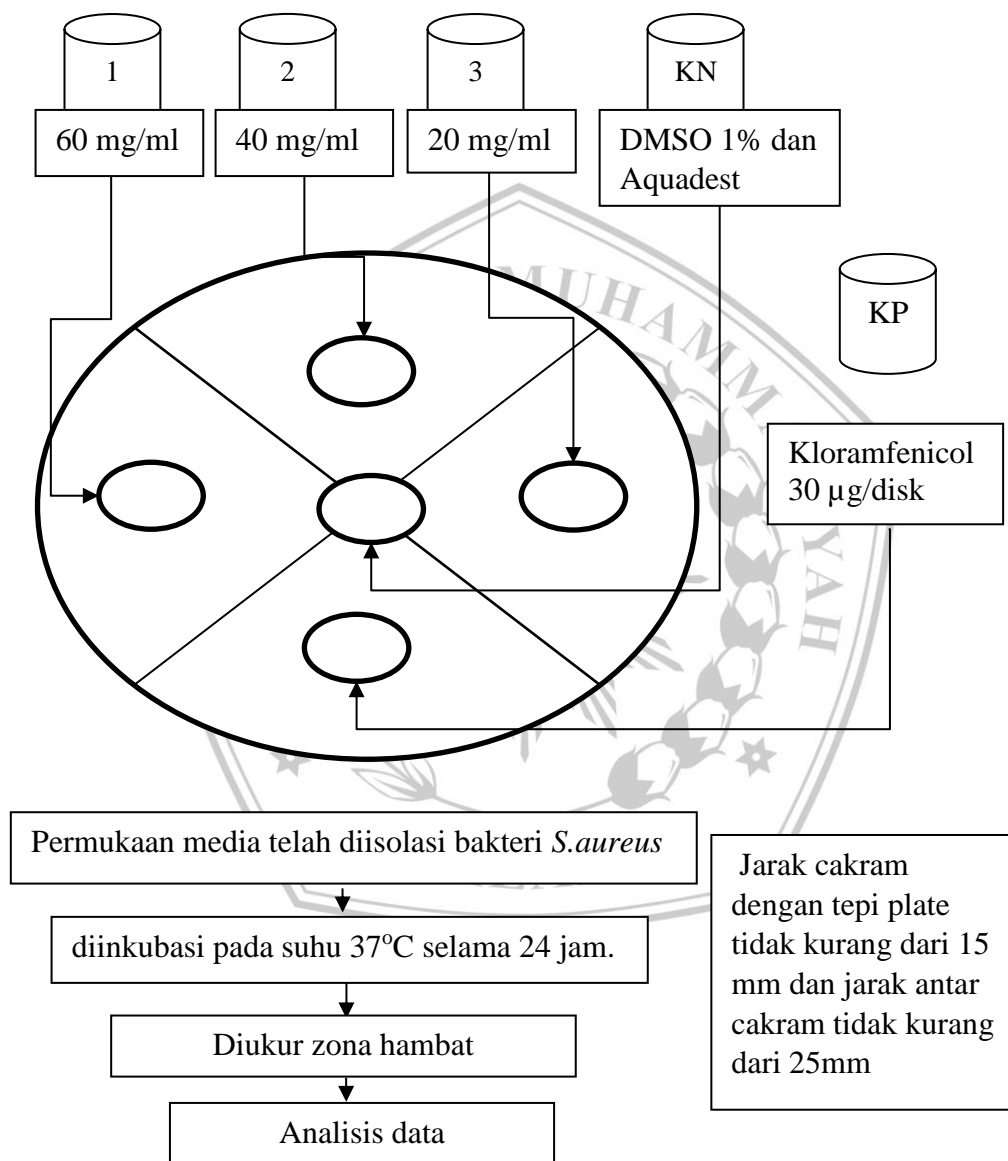
4.8.11 Pengujian Antibakteri Dengan Difusi Cakram

Pengujian bakteri *S. aureus* secara difusi cakram dilakukan secara aseptis di dalam *Laminar Air Flow* (LAF)

1. Disiapkan larutan uji masing-masing yang telah dimasukkan ke dalam eppendrop dengan konsentrasi yaitu 20mg/ml (konsentrasi 1); 40mg/ml (konsentrasi 2); dan 60mg/ml (konsentrasi 3), kontrol positif (Kolramfenikol 30 μg) dan kontrol negatif (DMSO 1% dan aquadest steril)
2. Disiapkan larutan uji fraksi etil asetat umbi *E.palmifolia* masing-masing di pipet 10 μl dengan konsentrasi yang telah ditentukan (konsentrasi 1,2, dan 3) kemudian kertas cakram kosong diletakkan di cawan petri yang telah berisi larutan uji kemudian dilakukan pengulangan 8 kali dan dikeringkan dengan oven suhu 37°C selama 5 menit tiap setelah cakram diisi dengan larutan uji. Sedangkan untuk kontrol negatif menggunakan DMSO 1% dengan perlakuan sama dengan larutan uji dan di oven suhu 37°C selama 10 menit.
3. Dilakukan replikasi sebanyak 3 kali.
4. Kertas cakram yang telah berisi konsentrasi larutan uji diletakkan diatas permukaan medium *Mueller Hinton Agar* (MHA) yang berisi biakan bakteri uji. Agar diperoleh kontak yang baik, kertas cakram dapat ditekan dengan lembut menggunakan pinset pada permukaannya. Jarak satu kertas cakram dengan kertas cakram yang lainnya diatur sedemikian rupa sehingga berjauhan.
5. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
6. Pengujian senyawa antibakteri dilakukan dengan pengamatan yang dilakukan setiap 24 jam dengan melihat adanya diameter zona (area) bening disekitar kertas cakram. Zona hambat yang terbentuk diukur dengan jangka sorong dalam satuan militer (mm).

4.9. Analisis Data

Analisis data dilakukan secara deskriptif dengan melakukan pengamatan terhadap pengukuran diameter zona hambat dari daerah berwarna bening dari masing-masing komponen senyawa yang telah dipisahkan pada fraksi etil asetat umbi *Eleutherine palmifolia* terhadap *Staphylococcus aureus*.



Gambar 4.2 Pengujian Antibakteri Dengan Difusi Cakram